

①② **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

①① Anmeldenummer: **88121675.8**

⑤① Int. Cl. 4: **C12N 15/00 , C12P 21/00**

②② Anmeldetag: **24.12.88**

③③ Priorität: **31.12.87 DE 3744595**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.07.89 Patentblatt 89/29

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: **Plückthun, Andreas, Dr.**
Veit-Lung-Strasse 6
D-8033 Planegg(DE)

Anmelder: **Skerra, Arne**
Cheruskerweg 6
D-6200 Wiesbaden(DE)

⑦② Erfinder: **Plückthun, Andreas, Dr.**
Veit-Lung-Strasse 6
D-8033 Planegg(DE)
Erfinder: **Skerra, Arne**
Cheruskerweg 6
D-6200 Wiesbaden(DE)

⑦④ Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al**
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

⑥④ **Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern.**

⑤⑦ Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern Funktionelle Antikörperfragmente kann man in Bakterien herstellen, wenn man die Gene für die einzelnen Ketten an je eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Präpeptide durch die cytoplasmatische Membran bewirken, die Genstrukturen in einem Bakterium zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium isoliert. Vorteilhaft isoliert man das funktionelle Protein durch Affinitätschromatografie an ein Adsorbens, das mit dem Hapten oder Antigen beladen ist, und Elution mit einer Lösung des Haptens oder Antigens.

EP 0 324 162 A1

Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern

Die Expression von Antikörpern in Hefe wurde beschrieben (C.R. Wood, M.A. Boss, J.H. Kenten, J.E. Calvert, N.A. Roberts and J.S. Emtage, *Nature* 314, 446 (1985)), aber nur ein sehr kleiner Anteil des exprimierten Proteins erwies sich als funktionell. In *E. coli* konnten bisher Antikörper-Proteine nur in denaturierter Form erhalten werden (M.A. Boss, J.H. Kenten, C.R. Wood and J.S. Emtage, *Nucleic Acids Res.* 12, 3791 (1984); S. Cabilly, A.D. Riggs, H. Pande, J.E. Shively, W. E. Holmes, M. Rey, L. J. Perry, R. Wetzel and H.L. Heyneker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3273 (1984)). Die Reinigung aktiver Antikörper oder Antikörperfragmente aus Hefe oder anderen Mikroorganismen ist noch nicht bekannt. Proteinfaltungsversuche haben bisher nur zu einem geringen Prozentsatz richtig gefalteter rekombinanter Antikörper Proteine geführt. Außerdem ist es schwierig, die gewünschten funktionellen Proteine von unerwünschten und nicht funktionellen Proteinen abzutrennen, was die genaue Messung von Bindungskonstanten, Ausbeuten bei der Faltung, spektralen Eigenschaften und dergleichen und die Anwendung in Therapie und Technik erschwert. Die Optimierung der Faltungsbedingungen ist deshalb außerordentlich schwierig, zumal es keine bewährten Verfahren und Meßmethoden für die Rückfaltung gibt.

Die Expression funktionaler kompletter Antikörper oder funktioneller Bindungsdomänen von Antikörpern in bakteriellen Expressionssystemen ist bisher nicht bekannt und die Aussichten zu ihrer Verwirklichung wurden pessimistisch beurteilt (S.L. Morrison, *Science* 229, 1202 (1985), M.A. Boss and C.R. Wood, *Immunol. Today* 6, 12 (1985)).

Ein solches System wäre sehr wünschenswert, da die gentechnischen Verfahren insbesondere für *E. coli* gut ausgearbeitet sind und aufgrund des schnellen Wachstums die Massenproduktion erleichtert ist, was ökonomisch von erheblicher Bedeutung ist.

Die Erfindung bezieht sich deshalb auf die Herstellung von funktionsfähigen Antikörpern, deren funktionelle Fragmente oder von Fusionsproteinen aus Antikörperdomänen und anderen Proteinen in Bakterien, vorzugsweise Gram-negativen Bakterien, insbesondere in *E. coli*. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die einzelnen Ketten des Antikörpermoleküls oder -fragments je an eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Polypeptidketten durch die cytoplasmatische Membran bewirkt und abgespalten werden kann, die Genstrukturen zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium isoliert. Bevorzugte Ausgestaltungen dieser Erfindung werden im folgenden näher erläutert bzw. in den Patentansprüchen definiert.

Die Koppelung der Gene für die einzelnen mit Signal-Sequenzen versehen Ketten erfolgt vorteilhaft in der Art eines regulierbaren Operon-Systems, das die gleichzeitige Expression durch eine gemeinsame Steuerungsregion bewirkt. Auf diese Weise werden die einzelnen Proteinketten im angenähert stöchiometrischen Verhältnis gemeinsam exprimiert und in den periplasmatischen Raum transportiert, wo die Verbindung zum funktionellen Molekül erfolgt. Der Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie sie beispielsweise in der EP-B 0 006 694 beschrieben sind.

Als Steuerungsregion kommt jede geeignete regulierbare Genregulationsregion in Betracht, beispielsweise *lac*, *tac*, *trp* oder synthetische Sequenzen. Besonders bevorzugt sind Regulationsregionen, die zuverlässig abschaltbar sind.

Die Isolierung der Proteine aus dem periplasmatischen Raum erfolgt vorteilhaft dadurch, daß man auf die abgeernteten Zellen einen milden osmotischen Schock ausübt und die hierbei erhaltene flüssige Phase durch Ultrafiltration oder Fällung, beispielsweise mit Salzen wie Ammoniumsulfat, aufkonzentriert.

Ein "milder" osmotischer Schock bewirkt das Austreten des Periplasmas, wobei aber die cytoplasmatische Membran intakt bleibt.

Das Proteinkonzentrat wird zweckmäßig nach einer Dialyse auf ein Adsorbens, vorteilhaft in Form einer Affinitätssäule, gegeben, das mit dem entsprechenden Antigen oder Hapten beladen ist. Durch geeignete Elution, vorteilhaft mit dem Antigen oder Hapten, erhält man dann den Antikörper bzw. das funktionelle Antikörperfragment.

In der eukaryotischen Zelle werden Antikörper im Lumen des endoplasmatischen Retikulums - wahrscheinlich unter Mitwirkung von Disulfid-Isomerasen, Prolin-cis-trans-Isomerasen und möglicherweise weiteren Enzymen oder Proteinen- gebildet. Es war überraschend, daß auch die Bakterienzelle in der Lage ist, die beiden Ketten in der etwa gleichen stöchiometrischen Menge herzustellen, beide Vorläuferproteine in den periplasmatischen Raum oder das sie umgebende Medium zu transportieren, die Signalsequenzen korrekt abzuspalten, die globulären und löslichen Domänen korrekt zu falten, die intramolekularen Disulfidbindungen zu bilden und beide Ketten zu einem Heterodimer zu assoziieren, da es als unwahrscheinlich gilt, daß die Bakterienzelle über solche oder gleichwirkende Enzyme verfügt. Es zeigte sich also überraschenderweise, daß im Falle Gram-negativer Bakterien das bakterielle Periplasma dem Lumen des eukaryo-

tischen endoplasmatischen Retikulums in dieser Beziehung funktionell äquivalent ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat eine Reihe von Vorteilen:

Abgesehen von der schon erwähnten leichten und billigen bakteriellen Massenfermentation werden unmittelbar funktionelle Proteine gebildet, wodurch also die Spaltung von Fusionsproteinen mit nachfolgender Isolierung des gewünschten Proteins oder Protein-Fragments, dessen Oxidation oder in-vitro-Rückfaltung vermieden werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wurden auch keine Probleme mit zellulären Proteasen festgestellt. Bekanntlich werden ja wegen dieser zellulären Proteasen Proteine in Bakterien üblicherweise in der Form von Fusionsproteinen, insbesondere als unlösliche Einschlußkörper, exprimiert, was aber die genannten aufwendigen Weiterverarbeitungsschritte mit sich bringt. Demgegenüber ist die Abtrennung und Reinigung bis zur Homogenität beim erfindungsgemäßen Verfahren schnell und einfach.

Die Erfindung erlaubt also einen leichten Zugang zu Antikörpern, ihren funktionellen Fragmenten und abgewandelten Antikörpern, die sich durch Einfügung, Eliminierung und/oder Austausch von Aminosäuren von den nativen Antikörpern unterscheiden. So kann man beispielsweise Cysteine eliminieren oder durch andere Aminosäuren ersetzen, um eine unerwünschte Faltung zu unterdrücken. Genauso kann man einen murinen Antikörper in einen humanen überführen, oder andere Mutationen einführen. Neben den pharmakologischen und technischen Anwendungsmöglichkeiten besteht somit ein erleichteter Zugang zur Erforschung der Antikörperstruktur und -funktion und der Grundlagen der enzymatischen Katalyse (V. Raso and B.D. Stollar, *Biochemistry* 14, 584 (1975); V. Raso and B.D. Stollar, *Biochemistry* 14, 591 (1975); A. Tramontano, K.D. Janda and R.A. Lerner, *Science* 234, 1566 (1986); S.J. Pollack, J.W. Jacobs and P.G. Schultz, *Science* 234, 1570 (1986); J. Jacobs, P.G. Schultz, R. Sugawara and M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2174 (1987)).

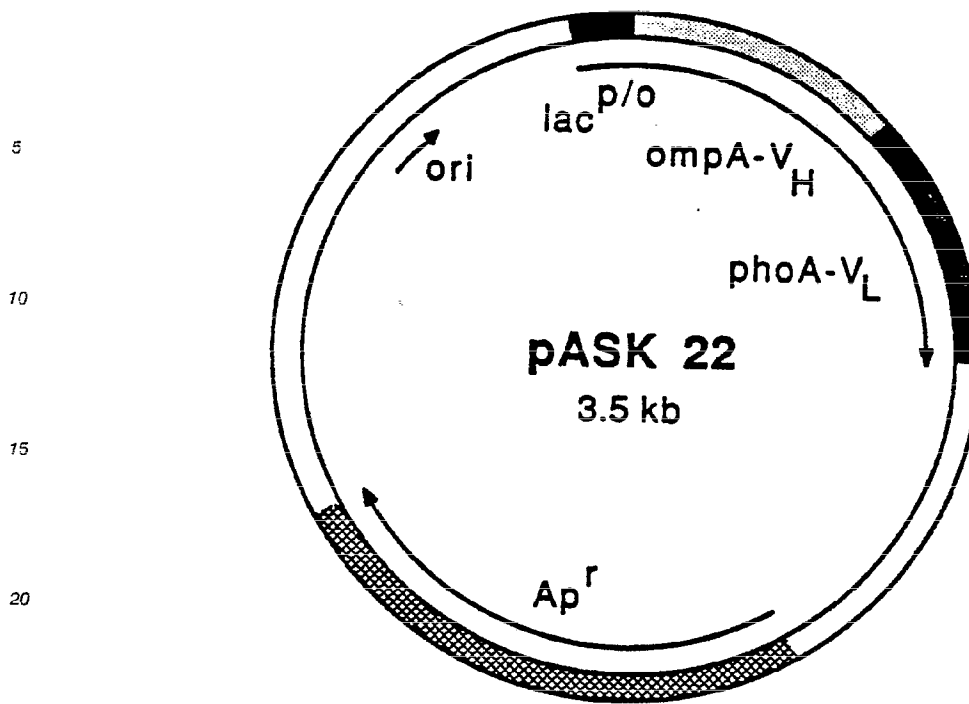
Die Erfindung erlaubt weiterhin die Anwendung von Testsystemen (Assays) unmittelbar auf die bakterielle Zelle, in der der funktionelle Antikörper gebildet wird, und damit eine schnelle Untersuchung auf gegebenenfalls mutierte Antikörper.

Neben den genannten Variationen des Antikörpermoleküls durch Variation einzelner oder weniger Aminosäuren können in das Antikörper-Gen auch andere Genregionen eingefügt oder Teile gegen unkritische Genregionen ausgetauscht werden. Man kann so Markierungsenzyme (M.S. Neuberger, G.T. Williams and R.O. Fox, *Nature* 312, 604 (1984)), Toxine (G. Möller (ed.) "Antibody carriers of drugs and toxins in tumor therapy", *Immunol. Rev.* 62, Munksgaard, Copenhagen (1982)) oder Immunglobulin-Regionen einer anderen Klasse (M.S. Neuberger, G.T. Williams, E.B. Mitchell, S.S. Jouhal, J.G. Flanagan, and T.H. Rabbitts, *Nature* 314, 268 (1985)) oder einer anderen Species (P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, and G. Winter, *Nature* 321, 522 (1986)) an das Antikörpermolekül koppeln.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden am Beispiel der variablen Domänen des Phosphorylcholin-bindenden Antikörper-Myelom-Proteins McPC603 erläutert. Die dreidimensionale Struktur dieses Mäuse-Immunglobulin A ist bekannt (D.M. Segal, E. A. Padlan, G.H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter and D.R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4298 (1974)). Eingesetzt wurden synthetische Gene für die variable leichte Kette V_L und schwere Kette V_H . Solche synthetischen Gene sind in der deutschen Offenlegungsschrift 37 15 033 bzw. der EP-A 0 290 005 und der AU-A 15631/88 (dort Tabellen 1 und 2) vorgeschlagen. Eine besonders zweckmäßige Ausgestaltung solcher synthetischen Gene zeigt die Tabelle, in der die DNA-Sequenz des gesamten Expressionsplasmids wiedergegeben ist und die Gene für die beiden Ketten durch die Aminosäurengabe hervorgehoben sind. Bei der Konstruktion dieser DNA-Sequenzen wurden Kodons vermieden, die von *E. coli* selten verwendet werden. Weiterhin wurden singuläre Restriktionsenzym-Schnittstellen eingebaut und auf die Sekundärstruktur der RNA Rücksicht genommen.

Bei dem als Modell dienenden funktionellen Antikörper-Fragment hat jede Domäne eine intramolekulare Disulfidbrücke (von Cys 23 zu Cys 94 in V_L und von Cys 22 zu Cys 98 in V_H). Es existiert keine Disulfidbrücke zwischen den Ketten und auch keine freies Cystein.

Der eingesetzte Expressionsvektor pASK 22 ist schematisch in der folgenden Formel



wiedergegeben. In ihr sind die synthetischen Gene für die V_L - und die V_H -Domänen an Genfragmente für die bakterielle Signalsequenz des Äußeren Membranproteins A (ompA) einerseits und der Alkalischen Phosphatase (phoA) andererseits gekoppelt. Die Gene für die beiden Vorläuferproteine sind in einer künstlichen Operon-artigen Struktur hinter dem lac-Promotor angeordnet, wodurch die gleichzeitige Induktion, Koexpression und Kosekretion beider Gene gewährleistet ist.

Nach der Induktion der Genexpression werden die Zellen geerntet und einem milden osmotischen Schock ausgesetzt. Die hierbei erhaltene Flüssigphase, die die periplasmatischen Proteine enthält, wird durch Ultrafiltration konzentriert, dialysiert und direkt auf eine Affinitätssäule aufgetragen, die ein Phosphorylcholderivat (B. Chesebro and H. Metzger, Biochemistry 11, 766 (1972)) als Affinitätsliganden enthält. Durch Elution mit Phosphorylcholin erhält man ein homogenes F_V -Fragment, das gelelektrophoretisch einheitlich ist. Aus dem SDS-Polyacrylamidgel läßt sich ableiten, daß beide Ketten des gereinigten F_V -Fragments in einem Molverhältnis von 1:1 vorhanden sind und die erwarteten Molgewichte der reifen Proteine (V_H : 13600 D, V_L : 12400 D) vorliegen. Zum Nachweis der korrekten Abspaltung beider Signalsequenzen wurden die sechs N-terminalen Aminosäuren beider Ketten sequenziert. Es ergab sich, daß beide Ketten die korrekten N-Termini für die reifen Proteine aufwiesen. Es wurden also beide heterologen Präproteine durch die bakterielle Signalpeptidase richtig gespalten und es ist kein Anhaltspunkt erkennbar, daß eine unpräzise Prozessierung oder eine N-terminale Abbaureaktion erfolgte.

Die Affinitätskonstante des rekombinanten F_V -Fragments von McPC603 wurde durch Gleichgewichtsdialyse gemessen. Hierbei wurden die gleichen Bedingungen verwendet, die bei der Bestimmung der Affinitätskonstante des nativen Antikörpers McP603, isoliert aus Maus-Aszites, angewandt wurden. Der für das F_V -Fragment gefundene Wert von $1,21 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ist innerhalb der Experimentiergenauigkeit identisch mit dem für den nativen Antikörper berichteten Wert $1,6 \pm 0,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Die Bindungskurve nach Scatchard (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)) ist linear und die Extrapolation zeigt an, daß annähernd 1 Mol Hapten pro Mol F_V -Fragment gebunden sind. Hierdurch wird bestätigt, daß es nur eine Art von Bindungsstellen pro F_V -Fragment gibt und daß in dem isolierten Protein keine inaktiven Bestandteile vorhanden sind.

Es hat sich also überraschenderweise gezeigt, daß man das F_V -Fragment des Antikörpers McPC603 als völlig funktionelles und stabiles Protein in E. coli herstellen kann. Hierdurch wird die funktionelle Äquivalenz des Transports in das Periplasma der Bakterienzelle zum Transport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums der eukaryotischen Zelle bewiesen. Diese Äquivalenz ist unbekannt und auch unvermutet, da das bisher am besten charakterisierte bakterielle Protein, das als lösliches heterodimeres Protein im Periplasma definiert werden könnte, die E. coli-Penicillin-Acylase, durch proteolytische Prozessierung aus einem einzelkettigen Vorläufer im Periplasma entsteht (G. Schumacher, D. Sizmann, H. Hang, P. Buckel

and A. Böck, Nucleic Acids Res. 14, 5713 (1986)). Außerdem wurde bereits darauf hingewiesen, daß nach derzeitiger Kenntnis Bakterien keine Enzyme oder Proteine besitzen, die in Eukaryonten an der Faltung beteiligt sein könnten.

Überraschend war auch, daß das F_V-Fragment von McPC603 im wesentlichen die gleiche Affinitätskonstante für Phosphorylcholin hat wie der intakte Antikörper McPC603 selbst. Dieser Befund ist unerwartet, da die Funktionalität von F_V-Fragmenten in der Literatur umstritten ist (J. Sen and S. Beychok, Proteins 1, 256 (1986)). Hierdurch zeigt sich, daß eine Modifikation oder sogar komplette Deletion der konstanten Domänen die Funktionalität erhalten kann.

Im Gegensatz zu der bisher einzigen Methode zur Herstellung von F_V-Fragmenten, nämlich durch Proteolyse eines Antikörpers, ergeben sich beim erfindungsgemäßen Verfahren keine Probleme mit nicht-funktionellen, nicht korrekt gefalteten, nicht korrekt reassozierten oder chemisch modifizierten Proteinen. Im übrigen eignet sich das bevorzugte Isolierungsverfahren mit Hilfe eines Antigen- oder Hapten-beladenen Adsorbens auch dazu, solche nach bekannten Verfahren erhaltenen F_V-Fragmente zu reinigen, da solche Verunreinigungen entweder nicht gebunden oder nicht eluiert würden.

Beispiel 1: Herstellung des Plasmids pASK22:

Das Expressionsplasmid pASK22 wird aus dem großen EcoRI-HindIII-Fragment von pUC12 (C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing, Gene 33, 103 (1985)), aus Fragmenten der Vektoren pIN III-OmpA1 (Y. Masui, J. Coleman and M. Inouye in "Experimental manipulation of gene expression", M. Inouye, ed., Academic Press 1983) und pH161 (H. Inouye, W. Barnes and J. Beckwith, J. Bacteriol. 149, 434 (1982)) sowie verschiedenen synthetischen DNA-Fragmenten in mehreren Stufen mit Hilfe von an sich bekannten Methoden (T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor 1982) konstruiert. Die vollständige DNA-Sequenz des so erhaltenen Vektors pASK22 ist in der Tabelle dargestellt.

Mit dem Ligationsgemisch werden kompetente E. coli-Zellen transformiert und auf Ampicillinresistenz selektiert. Die Plasmide mit der gewünschten Genstruktur werden durch Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung der kritischen Übergänge charakterisiert.

Beispiel 2: Herstellung des F_V-Fragments

Eine Kultur des mit pASK22 transformierten E. coli-Stammes W3110 wird in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 gezüchtet. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM wird die Expression induziert. Nach 45 Minuten werden die Zellen durch Zentrifugieren bei 4000 g (10 Minuten bei 4 °C) geerntet. Durch Resuspendieren des Zellpellets in TES-Puffer (0,2 M Tris·HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M Saccharose) in 10 ml/l der ursprünglichen Kultur wird eine Zellfraktionierung vorgenommen. Die Zellen werden durch Zugabe von 15 ml/l der ursprünglichen Kultur TES-Puffer, der 1:4 mit Wasser verdünnt ist und 2 mM Phosphorylcholin enthält, einem milden osmotischen Schock ausgesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wird die Suspension 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand erneut 15 Minuten bei 48 000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand, der alle löslichen periplasmatischen Proteine enthält, wird durch Ultrafiltration (^(R)AMICON YM5 Membran) auf ein Volumen von etwa 2,5 ml/l der ursprünglichen Kultur konzentriert und gegen BBS-Puffer (0,2 M Borat/NaOH, pH 8,0; 0,16 M NaCl) dialysiert. Diese konzentrierte Lösung wird auf eine mit einem Phosphorylcholin-Derivat (B. Chesebro and H. Metzger, a. a. O.) beladene Affinitätsäule gegeben (1-4 ml Lösung pro ml Bettvolumen), mit BBS-Puffer gewaschen und das reine F_V-Fragment mit einer Lösung von 1 mM Phosphorylcholin in BBS-Puffer eluiert.

Beispiel 3: Gleichgewichtsdialyse

In eine Dialysierkammer mit jeweils 100 µl Volumen auf jeder Seite der Membran wurden auf eine Seite 50 µl gereinigtes F_V-Fragment in BBS-Puffer und auf die andere Seite eine Lösung von 50 µl Phosphoryl-(methyl-¹⁴C) Cholin (50 mCi/mMol) in BBS-Puffer gefüllt. Aus der OD₂₀₅ von 6,85 wurde für das F_V-Fragment eine Konzentration von 0,22 mg/ml ermittelt (R.K. Scopes, Protein Purification-Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1982, S. 241). Nach einer Gleichgewichtseinstellung von 22 Stunden bei Raumtemperatur wurden 20 µl-Proben jeder Lösung in einem Szintillationszähler (Beckman LS 1801) gemessen und die Daten nach Scatchard (a.a.O.) aufgetragen. Aus der Steigung der erhaltenen Linie ergibt

sich eine Affinitätskonstante von $K_a = 1,21 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE

DNA-Sequenz von pASK22 mit Aminosäure-Sequenzen
von ompA-V_H und phoA-V_L

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

```

1  GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   CGCGGGTTATGCGTTTGGCGGAGAGGGGCGCGCAACCGGCTAAGTAATTACGTCGACCGT

   CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   GCTGTCCAAAGGGCTGACCTTTCGCCCCTCACTCGCGTTGCGTTAATTACACTCAATCGA

   CACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   GTGAGTAATCCGTGGGGTCCGAAATGTGAAATACGAAGGCCGAGCATACAACACACCTTA

   TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTTCTAGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   ACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCTTTGTGCGATACTGGTACTAATGCTTAAAGATCT

   TAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   ATTGCTCCCGTTTTTTTACTTTTTCTGTGCGATAGCGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAAG

   MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPhe -

   GCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGGTAGAGTCTGGTGGTGGTCTGGTACAGCCG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   CGATGGCATCGCGTCCGGCTTCAATTTGACCATCTCAGACCACCACCAGACCATGTCCGC

   AlaThrValAlaGlnAlaGluValLysLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnPro -

   GGTGGATCCCTGCGTCTGTCTTTCGCTACCTCAGGTTTCACCTTCTCTGACTTCTACATG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   CCACCTAGGGACGCAGACAGAACGCGATGGAGTCCAAAGTGAAGAGACTGAAGATGTAC

   GlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaThrSerGlyPheThrPheSerAspPheTyrMet -

   GAGTGGGTACGTCAGCCCCCGGTAAACGTCTCGAGTGGATCGCAGCTAGCCGTAACAAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   CTCACCCATGCAGTCGGGGGCCCATTTGCAGAGCTCACCTAGCGTCGATCGGCATTGTTT

   GluTrpValArgGlnProProGlyLysArgLeuGluTrpIleAlaAlaSerArgAsnLys -

   GGTAACAAGTATACCACCGAATACAGCGCTTCTGTTAAAGGTCGTTTCATCGTTTCTCGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
   CCATTGTTTATATGGTGGCTTATGTGCGGAAGACAATTTCCAGCAAAGTAGCAAAGAGCA

   GlyAsnLysTyrThrThrGluTyrSerAlaSerValLysGlyArgPheIleValSerArg -

   GACACTAGTCAATCGATCCTGTACCTGCAGATGAATGCATTGCGTGCTGAAGACACCGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
   CTGTGATCAGTTAGCTAGGACATGGACGTCTACTTACGTAACGCACGACTTCTGTGGCGA

   AspThrSerGlnSerIleLeuTyrLeuGlnMetAsnAlaLeuArgAlaGluAspThrAla -

```

```

5      601  ATCTACTACTGCGCGCGTAACTACTATGGCAGCACTTGGTACTTCGACGTTTGGGGTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGATGATGACGCGCGCATTGATGATACCGTCGTGAACCATGAAGCTGCAAACCCACGT
IleTyrTyrCysAlaArgAsnTyrTyrGlySerThrTrpTyrPheAspValTrpGlyAla -
10     661  GGTACCACCGTTACCGTTTCTTCTTGATAACATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATGGTGGCAATGGCAAAGAAGAACTATTGTACCTCTTTTATTTCACTTGTTCGTGA
GlyThrThrValThrValSerSerEnd                               MetLysGlnSerThr -
15     721  ATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGATATCGTTATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACGTGACCGTGAGAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTCGGCTATAGCAATAC
IleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaAspIleValMet -
20     781  ACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCTGTATCTGCAGGTGAACGTGTTACCATGTCTTGCAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGGTCAGAGGCTCGAGAGACAGACATAGACGTCCACTTGCACAATGGTACAGAACGTTT
ThrGlnSerProSerSerLeuSerValSerAlaGlyGluArgValThrMetSerCysLys -
25     841  TCTTCTCAGTCTCTGCTGAACCTCTGGTAACCAGAAAACTTCCTGGCGTGGTATCAGCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAAGAGTCAGAGACGACTTGAGACCATTGGTCTTTTTGAAGGACCGCACCATAGTCGTT
SerSerGlnSerLeuLeuAsnSerGlyAsnGlnLysAsnPheLeuAlaTrpTyrGlnGln -
30     901  AAGCCTGGCCAACCGCCGAAACTGCTGATCTACGGTGCCTCGACCCGTGAATCTGGTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCGGACCGGTTGGCGGCTTTGACGACTAGATGCCACGCAGCTGGGCACTTAGACCACAA
LysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrGlyAlaSerThrArgGluSerGlyVal -
35     961  CCGGACCGTTTTACCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTCGACCATCTCTTCTGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTGGCAAAATGGCCATCGCCATCGCCATGGCTGAAGTGAGACTGGTAGAGAAGACAT
ProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerVal -
40    1021  CAGGCTGAAGATCTGGCTGTTTACTACTGTCAAAACGACCACTCTTACCCGCTGACCTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCGACTTCTAGACCGACAAATGATGACAGTTTTGCTGGTGAGAATGGGCGACTGGAAA
GlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCysGlnAsnAspHisSerTyrProLeuThrPhe -
45    1081  GGC GCCGGCACCAAACTGGAACCTGAAGCGCGCTTGATAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGCGGCCGTGGTTTTGACCTTGACTTCGCGCGAACTATTGCAACCGTGACCGGCAGCAAA
GlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaEnd
50    1141  TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAG
1201  CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGAAAGCGGTCGACCGCATTATCGCTTCTCCGGGCGTGGCTAGCGGGAAGGGTTGTCA
55

```


5 1261 TGGCGAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCG 1320
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGCGTCGGACTTACCGCTTACCGCGGACTACGCCATAAAAGAGGAATGCGTAGACACGC

10 1321 GTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA 1380
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATAAAGTGTGGCGTATACCACGTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAATT

15 1381 GCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGG 1440
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGTCGGGGCTGTGGGCGGTGTGGGCGACTGCGCGGGACTGCCCGAACAGACGAGGGCC

20 1441 CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCAC 1500
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGGCGAATGTCTGTTCGACACTGGCAGAGGCCCTCGACGTACACAGTCTCCAAAAGTG

25 1501 CGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTA 1560
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCAGTAGTGGCTTTGCGCGCTCTGCTTTCCCGGAGCACTATGCGGATAAAAATATCCAAT

30 1561 ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG 1620
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACAGTACTATTATTACCAAAGAATCTGCAGTCCACCGTAAAAGCCCCCTTTACACGCGC

35 1621 GAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT 1680
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGGGGATAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTA

40 1681 AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC 1740
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGGGACTATTTACGAAGTTATTATAACTTTTTCCTTCTCATACTCATAAGTTGTAAAGG

45 1741 GTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCAGAAA 1800
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACAGCGGAATAAGGGAAAAACGCCGTAAAACGGAAGGACAAAAACGAGTGGGTCTTT

50 1801 CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC 1860
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGACCACTTTCATTTCTACGACTTCTAGTCAACCCACGTGCTCACCCAATGTAGCTTG

55 1861 TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA 1920
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAAGTCTCAAAAGCGGGGCTTCTTGCAAAAGGTTACT

1921 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG 1980
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTCGTGAAATTTCAAGACGATACACCGCGCCATAATAGGGCATAACTGCGGGCCGTTCT

2040 1981 AGCAACTCGGTGCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA 2040
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTTGAGCCAGCGGCGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACCAACTCATGAGTGGTCAGT

5

2041 CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCA 2100
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCTTTTCGTAGAATGCCTACCGTACTCTCATTCTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGT

10

2101 TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA 2160
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTCACTATTGTGACGCCGGTTGAATGAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCCTCGATT

15

2161 CCGCTTTTTCGACAAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC 2220
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGCGAAAAAACGTGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAACCTAGCAACCCCTTGGCCTCG

20

2221 TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA 2280
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTTACTTCGGTATGGTTTGCTGCTCGCACTGTGGTGCTACGGACATCGTTACCGTTGTT

25

2281 CGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG 2340
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCAACGCGTTTGATAATTGACCGCTTGATGAATGAGATCGAAGGGCCGTTGTTAATTATC

30

2341 ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT 2400
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGACCTACCTCCGCCTATTTCAACGTCCTGGTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCCGACCGA

35

2401 GGTATTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC 2460
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAAATAACGACTATTTAGACCTCGGCCACTCGCACCCAGAGCGCCATAGTAACGTCGTG

40

2461 TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA 2520
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCCCGGTCTACCATTCGGGAGGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCTCAGTCCGTT

2521 CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT 2580
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GATACCTACTTGCTTTATCTGTCTAGCGACTCTATCCACGGAGTGACTAATTCGTAACCA

45

2581 AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAAT 2640
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGACAGTCTGGTTCAAATGAGTATATATGAATCTAACTAAATTTTGAAGTAAAAATTA

50

2641 TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG 2700
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATTTTCCTAGATCCACTTCTAGGAAAAACTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCAC

55

2701 AGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC 2760
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCAAAAGCAAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCCTAGAAGAACTCTAG

2761 CTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGG 2820
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAAAAAGACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTGGTGGCGATGGTCGCCACC

5
 2821 TTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG 2880
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAGGCTTCCATTGACCGAAGTCGTCTC

 10
 2881 CGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT 2940
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGTCTATGGTTTATGACAGGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTCTTGA

 15
 2941 CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTG 3000
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACATCGTGGCGGATGTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCAC

 20
 3001 GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC 3060
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGCTATTACGACAGAAATGGCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCGCGTCG

 25
 3061 GGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG 3120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGCCCGACTTGGCCCCAAGCACGTGTGTGCGGTGGAACCTCGCTTGTGCTGGATGTGGC

 30
 3121 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG 3180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGACTCTATGGATGTGCGCACTCGATACTCTTTCGCGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTC

 35
 3181 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG 3240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCCTGTCCATAGGCCATTGCGCGTCCCAGCCTTGTCTCTCGCGTGCTCCCTCGAAGGTC

 40
 3241 GGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC 3300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCCTTTGCGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAG

 45
 3301 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT 3360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTAAAAACACTACGAGCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTGCGGTGCTTGCGCCGGA

 50
 3361 TTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCCTGCGTTATCCC 3420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATGCCAAGGACCGGAAAACGACCGGAAAACGAGTGTAAGAAAGGACGCAATAGGG

 55
 3421 CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCC 3480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACTAAGACACCTATTGGCATAATGGCGGAACTCACTCGACTATGGCGAGCGGCGTCGG

 3481 GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA 3523
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGCTGGCTCGCGTCGCTCAGTCACTCGCTCCTTCGCCTTCT

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von funktionellen Antikörpern, funktionellen Fragmenten von Antikörpern oder Fusionsproteinen aus Antikörperdomänen und anderen Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die einzelnen Ketten an je eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Polypeptidketten durch die cytoplasmatische Membran einer Bakterienzelle bewirken und dann abgespalten werden, die Genstrukturen in einem Bakterium zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium, isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium ein Gram-negatives Bakterium ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium E. coli ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die beiden Präpeptide in der Form eines regulierbaren Operon-Systems koppelt.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung des funktionellen Proteins aus dem periplasmatischen Raum die abgetrennten Bakterien einem solchen osmotischen Schock aussetzt, daß das Periplasma austritt, das Cytoplasma aber intakt bleibt, die hierbei erhaltene flüssige Phase durch Zentrifugieren anreichert und aus diesem Konzentrat die gewünschten Proteine gewinnt.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die das funktionelle Protein enthaltende Lösung auf ein mit dem entsprechenden Antigen oder Hapten beladenes Adsorbens gibt und die gewünschten Proteine durch Elution mit einer dieses Antigen oder Hapten enthaltenden Lösung isoliert.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 12 1675

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.3)
X	EP-A-0 234 592 (TEIJIN LIMITED) * Zusammenfassung; Seite 3, Zeile 15 - Seite 5, Zeile 3; Seite 5, Zeile 31 - Seite 6, Zeile 15; Seite 13, Beispiel C; Seite 16, Zeile 27 - Seite 17, Zeile 11; Seite 41, Beispiel 18; Seite 44, Beispiel 20; Ansprüche 1,7,9,10,23,24 *	1-6	C 12 N 15/00 C 12 P 21/00
Y	EP-A-0 196 864 (CETUS CORPORATION) * Zusammenfassung; Seite 3, Zeile 21 - Seite 4, Zeile 13; Seite 5, Zeile 28 - Seite 6, Zeile 14; Ansprüche 1-2,11 *	1-4	
D,Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA Band 81, Juni 1984, Seiten 3273-3277, Washington, US; S. CABILLY et al.: "Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in Escherichia coli". * Zusammenfassung, Figur 2, Seite 3274, Spalte 1 *	1-4	
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS Band 109, Nr. 3, 18. Juli 1988, Zusammenfassung Nr. 21334w; MARC BETTER et al.: "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment"; & SCIENCE 1988, Band 240, Nr. 4855, Seiten 1041-1043	1-3	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.3) C 12 N 15/00 C 12 P 21/00
P,X	BIOSIS DATABASE Zusammenfassung Nr. 85099940; K. KITAI et al.: "Extracellular production of human immunoglobulin G FC region H-IGG-FC by escherichia-coli"; & APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., Band 28, Nr. 1, 1988, Seiten 52-56	1-3	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	21-03-1989	JULIA P.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.3)		
P,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Band 12, Nr. 56 (C-477), 19. Februar 1988; & JP - A - 62 201 581 (RIKAGAKU KENKYUSHO) 5. September 1987 ---	1-4			
A	EP-A-0 120 694 (CELLTECH LIMITED) * Zusammenfassung; Seite 2, Zeilen 14-28, Seite 7; Zeile 15 - Seite 8, Zeile 28, Seite 10, Zeilen 30-35; Seite 12, Zeilen 12-15; Seite 35, Zeile 30 - Seite 37, Zeile 5; Ansprüche * ---	1-4			
A	CHEMICAL ABSTRACTS Band 101, Nr. 9, 27. August 1984, Zusammenfassung Nr. 67017h; ORNA ZEMEL-DREASEN et al.: "Secretion and processing of an immunoglobulin light chain in Escherichia coli"; & GENE, 1984, Band 27, Nr. 3, Seiten 315-322 -----	1-4			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.3)		
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 21-03-1989	Prüfer JULIA P.		
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</td><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument				